

ABSTRACT

Disulfide formation for protein import into the mitochondrial intermembrane space is an essential process. In mammalian cells, the key enzyme in this process is the oxidoreductase CHCHD4. Recently, proteomic studies unraveled the substrates of the pathway for the mammalian system, and these include four complex I subunits. In this work, the link between the disulfide relay and complex I biogenesis was studied. Here, the oxidative folding and import of these complex I subunits were analyzed, verifying the essential involvement of the disulfide relay for complex I assembly. Moreover, a cysteine mutation in one of these subunits, NDUFB10, presented with fatal infantile lactic acidosis and cardiomyopathy. The patient was found to have profoundly decreased activity of respiratory chain complex I in muscle, heart and liver. Protein expression of NDUFB10 was decreased in muscle and heart, and less so in liver and fibroblasts, resulting in perturbed assembly of the complex at the 830 kDa stage. The mutation of cysteine residue 107 in NDUFB10 impaired oxidation and efficient mitochondrial import of the protein in cell culture. This mutation in NDUFB10 has been a novel cause of complex I deficiency associated with a late stage assembly defect and emphasizes the role of intermembrane space proteins for the efficient assembly of complex I. In addition, the mutant NDUFB10 showed different protein amounts in a tissue-dependent manner. This led to the investigation of the *in vivo* CHCHD4 redox state, a factor which determines the mitochondrial import activity. Under basal conditions, endogenous CHCHD4 redox state in cultured cells and mouse tissues was predominantly oxidized, however degrees of oxidation in different tissues varied from 70 to 90% oxidized. To test whether differences in the protein levels of CHCHD4 and ALR might explain tissue-specific differences in the CHCHD4 redox state, the molar ratio of both proteins in different mouse tissues was determined. Surprisingly, ALR was superstoichiometric over CHCHD4 in most tissues. The ratio of ALR over CHCHD4 appeared to correlate only weakly with the redox state, and although ALR was present in superstoichiometric amounts, it did not lead to fully oxidized CHCHD4. Lastly, the interaction between CHCHD4 and AIF, which is crucial for complex I biogenesis, was studied. CHCHD4 and AIF formed a long-lasting complex, and the presence of this complex was necessary for efficient substrate oxidation. This hints at a novel function of AIF for the oxidative folding in the IMS which has not been observed before.

ZUSAMMENFASSUNG

Für den Proteinimport in den mitochondrialen Intermembranraum ist die Disulfidbrückenbildung ein essentieller Prozess. In Säugetierzellen ist das Schlüsselenzym in diesem Prozess die Oxidoreduktase CHCHD4. Die Substrate des menschlichen Enzyms wurden mit Hilfe von Proteomstudien identifiziert, darunter vier Komplex-I-Untereinheiten. In der vorliegenden Studie wurde die Disulfid-abhängige Biogenese von Komplex-I untersucht. Dabei wurde die oxidative Faltung und der Import dieser Komplex-I-Untereinheiten analysiert und die Beteiligung der Disulfidaustausch-Maschinerie für die Komplex-I-Assemblierung verifiziert. Eine Cysteinmutation in einer dieser Untereinheiten, NDUFB10, führte zu einer fatalen infantilen Laktatazidose und Kardiomyopathie. Es konnte eine stark verminderte Aktivität des Atmungskettenkomplexes I in Muskel, Herz und Leber des Patienten festgestellt werden. Die Proteinexpression von NDUFB10 war in Leber und Fibroblasten gering, und in Muskel und Herz kaum nachweisbar, was zu einem defekten Komplex mit einer Größe von etwa 830 kDa führte. Die Mutation des Cysteinrestes 107 in NDUFB10 beeinträchtigte die Oxidation und den effizienten mitochondrialen Import des Proteins in intakten Zellen. Diese Mutation in NDUFB10 stellt eine neue Ursache für eine Komplex I-Defizienz dar. Diese ist mit einem späten Biogenesedefekt assoziiert und betont die Rolle von Intermembranraumproteinen für die effiziente Assemblierung von Komplex I. Zudem lag NDUFB10 in Geweben in unterschiedlichen Mengen vor. Da dies auf einen ineffizienten mitochondrialen Proteinimport zurückzuführen sein kann, wurde der CHCHD4-Redoxzustand *in vivo*, bestimmt. Unter basalen Bedingungen ist der endogene CHCHD4-Redoxzustand in Zellen und Mausgeweben vorwiegend oxidiert, jedoch variierten die Oxidationsgrade in verschiedenen Geweben von 70 bis 90% oxidiert. Um zu testen, ob Unterschiede in der Proteinexpression von CHCHD4 und ALR gewebespezifische Unterschiede im CHCHD4-Redoxzustand erklären könnten, wurde das Verhältnis beider Proteine in verschiedenen Mausgeweben bestimmt. Überraschenderweise war ALR in den meisten Geweben überstöchiometrisch zu CHCHD4 vorhanden. Das Verhältnis von ALR zu CHCHD4 scheint nur schwach mit dem Redoxzustand zu korrelieren. Obwohl ALR in überstöchiometrischen Mengen vorliegt, wird CHCHD4 nicht vollständig oxidiert. Zuletzt wurde die Wechselwirkung zwischen CHCHD4 und AIF, die für die Biogenese von Komplex I von entscheidender Bedeutung ist, untersucht. CHCHD4 und AIF formten einen langlebigen Komplex, der für eine effiziente Substratoxidation notwendig war. Dies deutet auf eine neuartige Funktion

von AIF für die oxidative Faltung im Intermembranraum hin, die bisher noch nicht beobachtet wurde.